

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Hereditariedade Epigenética

Transgeracional

Marta Lacerda da Cunha

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Hereditariedade Epigenética Transgeracional

Marta Lacerda da Cunha

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professor Doutor Carolino Monteiro, Professor
Associado com Agregação**

2019

Resumo

A epigenética apresenta um papel importante em processos-chave biológicos. Está relacionada com alterações hereditárias e normalmente reversíveis não diretamente relacionadas com a sequência do DNA, mas sim com o modo como a informação genética é utilizada. O seu estudo tem vindo a contribuir para um maior conhecimento dos processos envolvidos na hereditariedade, como a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), modificação de histonas e os *non-coding ribonucleic acids* (ncRNAs). As alterações epigenéticas podem ser transmitidas à descendência através da hereditariedade epigenética inter e transgeracional. Na hereditariedade epigenética intergeracional ocorre uma modificação, em resposta a um estímulo, em F0, que se transmite para F1, no caso da alteração ocorrer num macho ou numa fêmea não prenha, ou em F1 e F2, caso a fêmea se encontre prenha. Na hereditariedade epigenética transgeracional, ocorre uma modificação, em resposta a um estímulo em F0, que apenas se verifica em F2 e gerações subsequentes, sem ter ocorrido exposição posterior a esse mesmo estímulo. Para que as modificações possam ser transmitidas por várias gerações sem que estas contactem com os estímulos é necessário haver plasticidade no DNA e que ocorra, posteriormente, acomodação e fixação da alteração associada ao fenótipo, e eventual *evolutionary rescue*. O stresse e a exposição a experiências consideradas traumáticas, como fome, guerra, exposição a químicos e até a migração forçada podem provocar alterações epigenéticas no DNA dos indivíduos afetados. Estas alterações podem ser transmitidas à descendência e às gerações subsequentes sob a forma de modificações tanto a nível físico como psicológico. São apresentados estudos que relacionam acontecimentos traumáticos experienciados com a hereditariedade epigenética transgeracional. Com a apresentação de vários estudos baseados na síndrome de stress pós-traumático (PTSD), podemos verificar a necessidade de consciencialização do cidadão, em geral, e do profissional de saúde, em particular, para esta temática. Tal, permitirá um maior acompanhamento aos indivíduos que experienciaram situações consideradas traumáticas, de modo a minimizar os efeitos transgeracionais.

Palavras-chave

Epigenética; PTSD; Metilação do DNA; Hereditariedade Epigenética Transgeracional

Abstract

Epigenetics plays an important role in key biological processes. It is related with inherited and usually reversible modifications, non-directly related to the DNA sequence, but to the way in which genetic information is used. The study of epigenetics contributes to the understanding of processes involved in inheritance, such as methylation of deoxyribonucleic acid (DNA), histone modification and non-coding ribonucleic acids (ncRNAs). Epigenetic changes can be transmitted to the offspring through inter and transgenerational epigenetic inheritance. In intergenerational epigenetic inheritance, a modification occurs, in response to a stimulus, in F0, which is transmitted to F1, if the change occurs in a non-pregnant female or in a male, in F1 and F2, if the female is pregnant. In the transgenerational epigenetic inheritance, a modification occurs in response to a stimulus in F0, but only will be present in F2 and subsequent generations, with no extra exposure to the same stimulus. In order to have modifications transmitted through several generations, with no further contact to the stimulus, it is necessary to have DNA plasticity with subsequent accommodation and fixation of the epigenetic event with consequences in the phenotype, and eventual evolutionary rescue. Stress and exposure to trauma, such as hunger, war, exposure to chemicals and even forced migration, for example, may cause epigenetic alterations in the DNA of those individuals. These changes can be transmitted to the offspring and subsequent generations, both physical and psychological. Such studies are presented which link experienced traumatic events to transgenerational epigenetic inheritance. Highlighting studies in post-traumatic stress disorder (PTSD), we emphasize the need of public awareness of such issue with a special focus within health practitioners to better care individuals who have experienced situations, and to monitor its effects transgenerationally.

Keywords

Epigenetics; PTSD; DNA methylation; Transgenerational Epigenetic Inheritance

Índice

<i>Resumo</i>	3
<i>Abstract</i>	4
<i>Índice de Figuras</i>	6
<i>Índice de Abreviaturas</i>	7
<i>Introdução</i>	9
Epigenética	9
Hereditariedade inter e transgeracional	10
Exposição ao stresse	11
<i>Objetivos</i>	13
<i>Materiais e Métodos</i>	13
<i>Resultados e Discussão de Resultados</i>	13
Processos envolvidos na Epigenética.....	13
Metilação do DNA	14
Histonas	16
Non-coding RNA	17
Acomodação genética e plasticidade do DNA	18
Ambiência gestacional	20
Espermatozóide e hereditariedade adquirida.....	22
Ócito e hereditariedade adquirida	23
Epigenética associada a químicos.....	23
PTSD.....	26
<i>Conclusão</i>	32
<i>Referências Bibliográficas</i>	33

Índice de Figuras

Figura 1 - Hereditariedade epigenética inter e transgeracional.. ..	10
Figura 2 - Padrões de metilação <i>de novo</i> em embriões humanos.....	15
Figura 3 – Alterações evolutivas na plasticidade fenotípica.. ..	20

Índice de Abreviaturas

- ACTH** - Hormona Adrenocorticotrófica
ADH - Hormona Antidiurética
ASD - Perturbação aguda de stresse
ATP - *Adenosine triphosphate*
BPA - Bisfenol A
CRH - Hormona libertadora de corticotrofina
DDT - Diclorodifeniltricloroetano
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNMTs - Metiltransferases de DNA
Esr1 - Gene associado ao recetor de estrogénio 1 em ratinhos
F0 - Progenitor
F1 - Primeira geração
F2 - Segunda geração
F3 - Terceira geração
F4 - Quarta geração
FKBP5 - *FKBP prolyl isomerase 5*
GR - Recetor glucocorticóide
GSI - *Global Severity Index*
H2A - Histona do tipo 2A
H2B - Histona do tipo 2B
Igf - *Insulin-like growth factor* em ratinhos
IGF-IR - IGF1 *receptor* em humanos
igf-ir - igf1 *receptor* em ratinhos
Igf2r - igf2 *receptor* em ratinhos
Ilhéus CpG - dinucleotídeos de citosina e guanina
lncRNA - *Long non-coding RNA*
MBP - *Methyl-CpG binding proteins*
miRNA - microRNA
mRNA - RNA mensageiro
NCD - *Noncommunicable Diseases*
ncRNA - *non-coding RNA*
NR3C1 - *Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*
PCB - Bifenilos policlorados
piRNA - *Piwi-interacting RNA*
PTSD - Síndrome de stresse pós-traumático
rDNA - DNA ribossomal

RISC - *RNA-induced silencing complex*

RNA – *Ribonucleic Acid*

rRNA - RNA ribossomal

SDQ - *Stregths and Difficulties Questionnaire*

SINEs - *Short interspersed nuclear elements*

sncRNAs - *Small non-coding RNAs*

sRNA - *Small RNA*

SUMO - *Small-ubiquitin like modifier*

tRNA - RNA transferência

tsRNA - *tRNA-derived small RNA*

Introdução

Epigenética

O estudo da epigenética tem vindo a ser desenvolvido nas últimas décadas, possuindo um papel importante em processos-chave biológicos (1,2). Relacionada com alterações hereditárias e normalmente reversíveis, a epigenética tem por base alterações no fenótipo que não se encontram relacionadas com a sequência do DNA, mas sim com o modo como a informação codificada é utilizada (1,3). Tem sido centro na pesquisa de doenças como o cancro, obesidade e doenças neurodegenerativas, apresentando também destaque no campo da saúde ambiental (4).

Considerando o epigenoma como um conjunto de modificações químicas que ocorrem no genoma e na cromatina, verificou-se que a ambiência tem a capacidade de o alterar (4,5). Pode permitir uma ativação de genes silenciados assim como o contrário, contribuindo para o desenvolvimento ou alteração do risco de doença (4,5). Estas modificações podem ocorrer devido à metilação do DNA, modificação de histonas ou no RNA que, quando ocorrem nos gametas, podem ser transmitidas de geração em geração (6).

É também importante definir o conceito de epimutação, consistindo numa alteração que pode ser hereditária, com origem em modificações aleatórias da cromatina numa determinada posição ou região (7). Tomando como exemplo a metilação da citosina, ocorrem processos aleatórios no processo de metilação de uma citosina isolada ou de uma região que contenha um *cluster* de citosinas, não implicando necessariamente uma alteração ao nível da expressão génica (7).

As epivariações são normalmente associadas a uma desregulação do funcionamento normal do genoma, podem ser consideradas como associadas a uma variabilidade fenotípica ou molecular entre organismos geneticamente idênticos que se distingue de ruído molecular ou plasticidade fenotípica na medida em que é potencialmente hereditária (8,9). Foram analisados doentes com patologias associadas ao desenvolvimento neurológico e com anomalias cognitivas, nos quais se observou que as epivariações poderiam estar associadas a *outliers* e/ou à expressão destes, e conservadas nos vários tecidos, permitindo o seu estudo através de amostras de DNA sanguíneo (8). Podem ainda ocorrer esporadicamente epivariações *de novo* e estarem relacionadas com a hereditariedade sugerindo uma reprogramação epigenética (8).

A influência paterna tem sido reportada como causa de alteração dos fenótipos da descendência (10). Tomando novamente como exemplo a metilação de uma citosina, 10 a

20% das alterações ocorrem em *loci* definidos e são consideradas como estando dentro dos parâmetros usuais para este processo (10). Como cada espermatozóide possui uma cópia haplóide do genoma, as alterações observadas ao nível da metilação refletem-se, passando a conter “ilhéus CpG” metilados numa determinada localização (10). O genoma do espermatozóide é metilado e desmetilado ao longo do seu processo de formação ficando cada um com um perfil de metilação específico no fim do processo (10). A epivariação é mais visível junto dos “ilhéus CpG” e das regiões de repetição, incluindo o DNA ribossomal (rDNA) (10). No entanto, o acompanhamento detalhado dos *loci* de rDNA revela que a variabilidade da metilação da citosina, observada nesses *cluster*, está relacionada com alterações no número de cópias de rDNA, sugerindo que as diferenças verificadas na metilação do rDNA entre animais se refletem na homeostase da produção de RNA ribossomal (rRNA) (10).

Hereditariedade inter e transgeracional

A hereditariedade epigenética pode apresentar-se de dois modos, hereditariedade epigenética inter ou transgeracional.

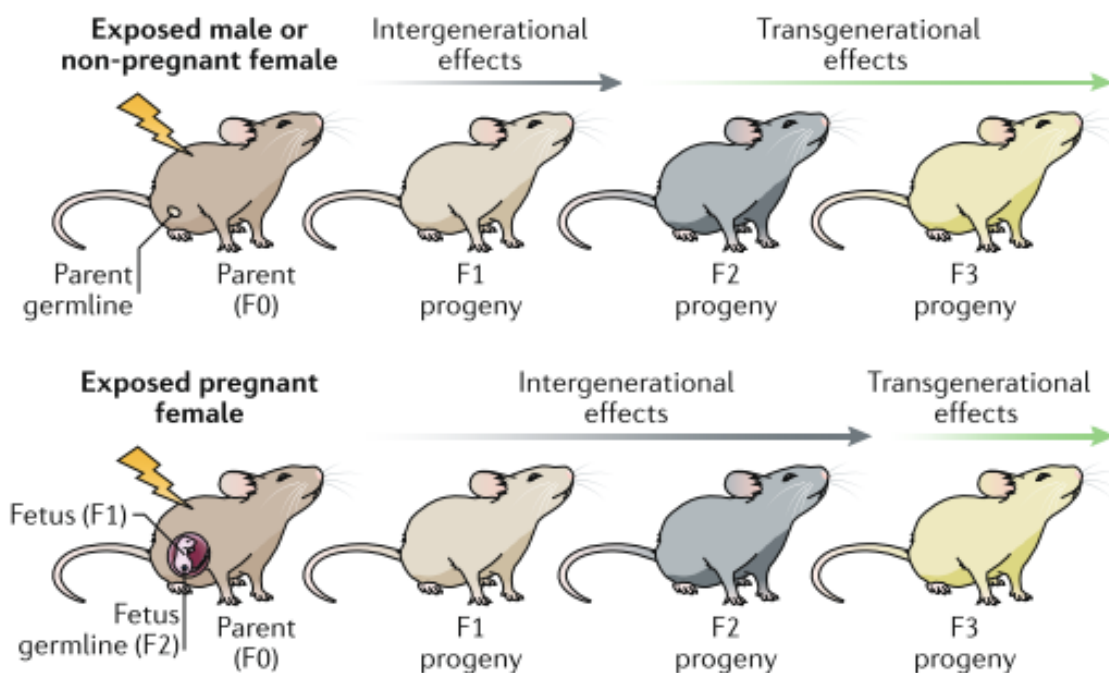


Figura 1 - Hereditariedade epigenética inter e transgeracional. Na linha superior mostra a exposição de um macho ou de uma fêmea não prenha a um estímulo que resulta numa transmissão intergeracional para F1 e transgeracional para F2 e gerações subsequentes. Na linha inferior mostra a exposição de uma fêmea prenha a um estímulo que resulta numa transmissão intergeracional para F1 e F2, uma vez que a linha germinativa de F1 é também afetada, e transgeracional para F3 e gerações subsequentes (6).

Nos mamíferos, caso o estímulo seja aplicado durante a gestação (F0), o feto (F1), assim como as células primordiais da linha germinativa que estarão envolvidas na formação de F2, são também afetadas, considerando-se hereditariedade epigenética intergeracional relativamente a F1 e F2 (11). No caso de a exposição ocorrer num macho ou numa fêmea não prenha considera-se hereditariedade epigenética intergeracional apenas para F1 (11).

Por outro lado, os efeitos transgeracionais referem-se exclusivamente a fenómenos que não podem ser descritos como diretamente relacionados a um estímulo específico no organismo afetado (12). Assim, estímulos que ocorram em F0 irão repercutir-se em F2 caso a exposição seja paterna ou materna e antes da concepção, ou em F3 caso a exposição seja materna e ocorra durante a gestação (11,12). Este efeito poderá ser transmitido às gerações subsequentes, mesmo na ausência de uma nova exposição, ao estímulo, da linha germinativa (Figura 1) (11).

Exposição ao stresse

Estudos realizados em humanos mostram que a exposição à fome, a disruptores endócrinos ou a situações traumáticas podem afetar a descendência e tem levado a uma mudança de paradigma em relação ao que se pensava sobre a hereditariedade (13). Estudos desenvolvidos em humanos têm sido limitados pelo baixo número de gerações avaliadas, pelas condições em que são analisadas e pela falta de conhecimento sobre os mecanismos na base deste tipo de transmissão (13). Os estudos realizados em animais permitem contornar estas limitações e obter maior informação sobre os mecanismos envolvidos na hereditariedade epigenética transgeracional (13).

O stresse, em contexto biológico e médico, é um fator físico ou psicológico que pode ser considerado agudo ou crónico, podendo causar tensão tanto a nível físico como psicológico (14). Pode ser induzido em resposta a um estímulo externo, como pela ambiência, ou interno por uma doença (14). Normalmente leva a uma resposta que envolve a ativação de processos endócrinos ou neurológicos (14). O stresse agudo é definido como uma resposta psicológica forte a um evento considerado novo ou a uma ameaça (14). Quando o evento que desencadeou esse stresse agudo é repetitivo ou suficientemente forte para induzir uma resposta persistente, geralmente passado um mês, torna-se crónico (14). O stresse traumático é um tipo particular de stresse que envolve uma reação aguda ou crónica a situações chocantes ou emocionalmente impressionantes implicando, normalmente, uma ameaça à integridade física ou psicológica de um indivíduo (14). Em humanos, o stresse traumático existe na forma de perturbação aguda de stresse (ASD) que pode ser classificada

como PTSD se persistir por mais de um mês (14). As duas perturbações são caracterizadas por sintomas como memórias recorrentes ou sonhos do evento traumático, amnésia traumática, entre outros (14). Observou-se que situações de trauma ocorridas durante a infância, como abuso físico ou sexual, fraco acompanhamento parental, catástrofes naturais ou deslocação forçada poderão ser estímulos com potencial para desencadear o stresse traumático (14). Eventos traumáticos testemunhados ou experienciados em idade adulta, entre eles abuso físico e psicológico, combates militares ou doenças, podem também desencadear stresse traumático crónico (14). O stresse traumático prolongado pode levar a alterações na saúde mental (14). Estudos realizados em humanos indicam que a PTSD desenvolve comorbilidades, como ansiedade e depressão, e é associada a uma elevada prevalência e incidência de demência (14). Este fenómeno pode ser associado à diminuição do volume do hipocampo, observado em indivíduos que sofrem de PTSD (14). É também um fator de risco para doenças mentais e cardiovasculares, alterações gastrointestinais, artrite reumatóide e cancro (14).

A nível molecular, o stresse traumático altera a integridade do eixo hipotálamo-hipófise, que influencia a libertação da hormona libertadora de corticotrofina (CRH), no hipotálamo, que estimula a libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) através da hipófise que, por sua vez, estimula a libertação do cortisol a partir das glândulas adrenais (14). É importante referir que o cortisol, por um mecanismo de *feedback* negativo inibe a libertação de ACTH que, por sua vez, inibe a libertação de CRH também por um mecanismo de *feedback* negativo (14). Indivíduos com PTSD têm alterações ao nível do eixo hipotálamo-hipófise, incluindo na libertação da CRH, alterando a libertação da ACTH e do cortisol (14). No entanto, alguns estudos sugerem o envolvimento dos baixos níveis de cortisol no desenvolvimento da PTSD e de outras doenças relacionadas com o stresse, provocadas pelo stresse traumático (14). O stresse traumático afeta a expressão e funcionamento dos mineralocorticóides, necessários na regulação da atividade basal do eixo hipotálamo-hipófise e memórias traumáticas (14). Pode ainda desregular o equilíbrio entre a oxitocina e a hormona antidiurética (ADH), hormonas com um papel essencial na regulação de respostas psicológicas e sociais (14).

Os efeitos do stresse traumático no cérebro são mais profundos consoante o período da vida do indivíduo em que a exposição ocorre (14). O cérebro é particularmente sensível a estímulos da ambiência durante o período pré-natal, no recém-nascido e durante a puberdade devido à sua elevada plasticidade, aumento da neurogénese, à imaturidade relativa dos processos de resposta ao stresse e da dinâmica neuroendócrina (14). Em estudos realizados em animais mostrou-se que estes períodos são também sensíveis a efeitos transgeracionais (14).

Objetivos

Evidenciar que as experiências consideradas traumáticas têm implicação por várias gerações, após o contacto inicial com a mesma, sem ser necessário uma exposição subsequente a uma experiência traumática.

Materiais e Métodos

Foram utilizados artigos científicos incluídos em bases de dados e revistas de especialidade (genética, epigenómica, fisiologia, endocrinologia, psiquiatria, neurociência), assim como dados sustentados apresentados nesses mesmos artigos. Foram ainda realizadas reuniões com o orientador para discussão dos conteúdos apresentados.

As fontes de informação utilizadas contêm conteúdos inequívocos e relevantes acerca da epigenética e hereditariedade epigenética transgeracional, mecanismos associados à epigenética, acomodação e plasticidade do DNA e conceitos e estudos relacionados com a PTSD.

Serão consideradas como referências bibliográficas, fontes que contenham conceitos pertinentes para a explicação do exposto. Iniciar-se-á por uma explicação dos conceitos básicos, seguido de exemplos que mostram evidência na relação entre experiências consideradas traumáticas e alterações verificadas na descendência.

Resultados e Discussão de Resultados

Processos envolvidos na Epigenética

Os mecanismos mais estudados envolvidos na hereditariedade epigenética, baseiam-se em modificações do modo como o DNA se encontra na cromatina e de como afetam a expressão dos genes (1). Estas modificações ocorrem em várias espécies, incluindo plantas, insetos, peixes, aves e mamíferos (15). Não sendo causado por uma mutação, necessita que as alterações ocorram na linha germinativa (espermatozóide ou ócito), de modo a permitir a transmissão do epigenoma modificado ao zigoto (15). As exposições a elementos que provoquem estas modificações têm sido associadas a doenças transgeracionais, bem como a variações fenotípicas, que em alguns casos se mantêm por centenas de gerações (15).

Estes mecanismos dependem de várias atividades enzimáticas que afetam a acetilação, metilação e fosforilação das caudas de histonas (predominantemente dos aminoácidos lisina, arginina e serina) bem como a metilação da citosina (16). Podem também afetar os processos de desmetilação, desacetilação, desfosforilação e o *adenosine triphosphate (ATP)-dependent chromatin remodeling*, ou seja, de proteínas que modificam ativa e transitoriamente a estrutura nucleossómica (16).

Metilação do DNA

A metilação do DNA foi o primeiro processo a ser identificado como alteração epigenética transgeracional na linha germinativa (15). Apesar de ter sido identificada em vários organismos os seus padrões e distribuição variam amplamente, sugerindo que estes possam ter diferentes funções e modos de direcionar elementos específicos de DNA, conforme o grupo taxonómico em estudo (7).

É um processo enzimático catalisado por metiltransferases de DNA (DNMTs), que ocorre quase exclusivamente nos dinucleotídeos de citosina e guanina (“ilhéus CpG”) nos quais um grupo metil se liga covalentemente à quinta posição do resíduo de citosina, formando a 5-metilcitosina, de modo a alterar a expressão génica (14,16). Da catalização realizada pelas DNMTs é de realçar o envolvimento da DNMT1, responsável pela manutenção dos padrões de metilação durante a replicação celular e das DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (isoforma de DNMT não catalítica denominada de DNMT3-like) que se encontram envolvidas no estabelecimento de novos padrões de metilação do DNA (metilação *de novo*) (16). A metilação está envolvida em processos importantes para o desenvolvimento inicial como o *imprinting* genómico, inativação do cromossoma X, silenciamento do transposão, entre outros (14,16).

A metilação dos “ilhéus CpG” encontra-se presente tanto na região promotora como na região codificante na transcrição génica (14). Quando a região promotora é afetada, é normalmente associada ao silenciamento génico, no entanto, quando envolve um gene transcrito, o processo pode aumentar a transcrição do mesmo (16). O silenciamento ocorre por inibição direta da ligação de fatores de transcrição ou por recrutamento de *methyl-CpG binding proteins* (MBPs) e de componentes responsáveis pela inibição da remodelação da cromatina (14). Evidências recentes mostram que em muitas células, incluindo células como neurónios adultos, a metilação do DNA é regulada dinamicamente e os “ilhéus CpG” podem ser ativamente metilados e desmetilados (14).

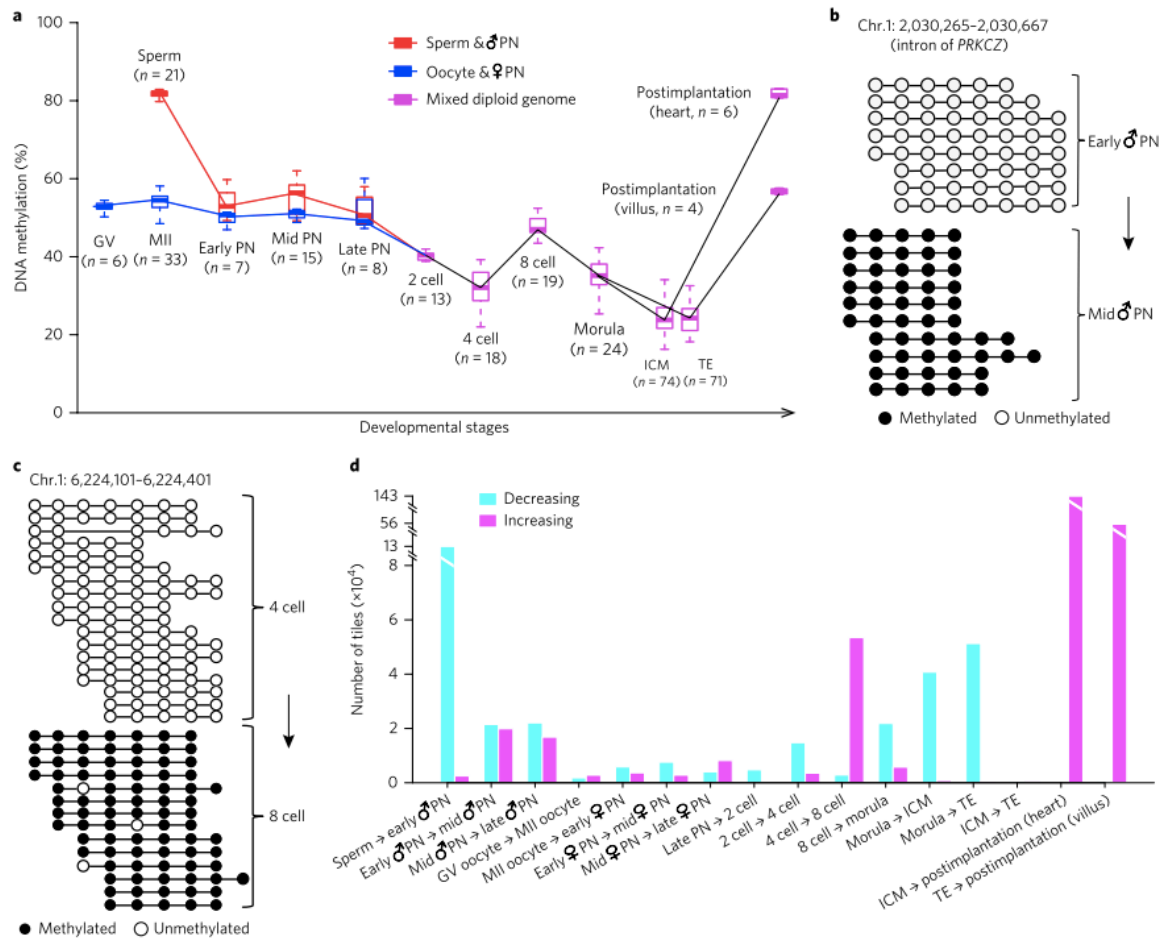


Figura 2 - Padrões de metilação *de novo* em embriões humanos. a. *Box plots* mostram a dinâmica de metilação durante os vários estádios do desenvolvimento. Verificaram-se duas ondas significativas de metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário, uma entre o estágio precoce do pronúcleo masculino e o estágio de pronúcleo intermédio masculino e a outra entre o estágio das 4 e 8 células. b. *Locus* representativo de uma elevada metilação *de novo*, no espermatózoide, verificada entre o estágio de pronúcleo precoce e intermédio. c. *Locus* representativo de uma elevada metilação *de novo* entre os estádios de 4 e 8 células. d. Histograma que mostra o número de títulos de metilação que aumentam (cor-de-rosa) ou diminuem (azul) em estádios de desenvolvimento consecutivos (17).

Durante a pré-implantação ocorre, no humano, uma reprogramação global da metilação do DNA (17). Considera-se o estágio precoce do pronúcleo, 10 a 11 horas após a fertilização, o estágio intermédio do pronúcleo, 22 a 23 horas após fertilização, e o estágio tardio do pronúcleo, 25 horas após fertilização (17). Uma análise detalhada identificou três ondas de desmetilação em embriões pré-implantados, a primeira ocorre entre as 10 e 12 horas após a fertilização (17). O valor médio do nível de metilação do DNA do genoma diminuiu de 82% no espermatózoide para 52,9% no estágio precoce do pronúcleo masculino, ao mesmo tempo que o valor médio do nível de metilação do DNA do genoma materno diminuiu de 54,5% no oócito maduro para 50,7% no estágio precoce do pronúcleo feminino (17). As regiões

genómicas desmetiladas durante esta onda correspondem a *enhancers* e *gene body regions* indicando que as regiões desmetiladas mais precocemente correspondem a elementos funcionais importantes (17). A segunda onda de desmetilação global ocorre do estágio de zigoto tardio até ao estágio das 2 células, com um decréscimo acentuado da metilação, passando de 49,9% para 40,4% (17). A terceira onda ocorre do estágio das 8 células até à mórula com os níveis de metilação a diminuírem dos 47% para os 35,1% (Figura 2a) (17). Estas duas últimas ondas ocorrem em regiões enriquecidas com intrões e *short interspersed nuclear elements* (SINEs), especialmente a subfamília de elementos Alu (17). Foi ainda identificado que durante a pré-implantação, no humano, ocorre um elevado nível de metilação *de novo* do DNA (17). Foi encontrada evidência da existência de duas ondas de metilação *de novo* do DNA, uma desde o estágio precoce do pronúcleo masculino até ao estágio intermédio do pronúcleo masculino (Figura 2b) e outra desde o estágio das 4 células até ao estágio das 8 células (Figura 2c) (17). Esta identificação mostra que a metilação *de novo* ocorre durante a pré-implantação do embrião humano, e a reprogramação da metilação global do DNA é, afinal, um equilíbrio dinâmico entre a desmetilação e a remetilação em todo o genoma (Figura 2d) (17).

A manutenção da metilação é também um processo crucial para assegurar a continuidade da identidade estrutural e funcional das células somáticas durante a divisão celular (16). Consideram-se a metilação *de novo*, a manutenção da metilação e a desmetilação como essenciais para o desenvolvimento embrionário e para a hereditariedade epigenética (16).

Histonas

A pesquisa feita tem sido direcionada para as modificações de histonas (metilação e acetilação, principalmente) associadas com a expressão de genes em células somáticas (14,15). Além das modificações mencionadas, as histonas podem ainda sofrer alterações por fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (14,15). São maioritariamente removidas durante a espermatogénese e substituídas por protaminas que permitem a compactação do DNA na cabeça do espermatozóide (15).

A modificação por acetilação ocorre normalmente nos resíduos de lisina e serina enquanto a fosforilação ocorre nos resíduos de treonina e tirosina, sendo que ambos os processos se encontram associados à ativação transcricional (14). Por outro lado, a metilação de histonas que ocorre nos resíduos de lisina encontra-se normalmente associada a genes transcritos ou silenciados (14). A ubiquitinação de histonas ocorre de modo similar, associada tanto ao silenciamento como à ativação transcricional, dependendo do local em que ocorre o processo, H2A ou H2B, respetivamente (14). Pode também ocorrer um outro processo denominado de

sumoilação de histonas em que ocorre a adição de um *small-ubiquitin like modifier* (SUMO), que regula negativamente a transcrição de genes frequentemente associados a outros reguladores epigenéticos (14).

É ainda importante referir que várias modificações pós-transcricionais em histonas são afetadas tanto por situações de stresse agudo como crónico (14). As principais cascatas induzidas pelo stresse, como a do glutamato ou da corticosterona, podem contribuir para a regulação das modificações pós-transcricionais em histonas, para a modulação da expressão e perfil de expressão dos genes (14).

Non-coding RNA

Existem vários mecanismos possíveis para o transporte da informação epigenética entre gerações, estes podem encontrar-se associados aos ncRNAs, como os microRNAs (miRNAs), tRNA-derived small RNAs (tsRNAs), *piwi-interacting* RNA (piRNAs) e *long non-coding* RNA (lncRNAs), que atuam potencialmente como mediadores da hereditariedade transgeracional induzida pela ambiência e no desenvolvimento de um indivíduo (11,14,16).

Os *small* RNAs (sRNAs) possuem uma dimensão inferior a 200 nucleotídeos e são normalmente considerados como moléculas de ncRNAs cruciais para a regulação da expressão génica após transcrição, especialmente quando envolvidos em processos de desenvolvimento, diferenciação, proliferação celular, apoptose e oncogénese (18).

Os *small non-coding* RNAs (sncRNAs), em especial os miRNAs e os tsRNAs, têm sido sugeridos como mediadores da transmissão da informação epigenética, através dos espermatozóides, em mamíferos (12). Os tsRNAs, derivados do RNA de transferência (tRNA), possuem diversas dimensões e mecanismos de biogénese e têm sido associados a vários processos celulares como a inibição de transposições (12). Segundo alguns estudos em roedores, os tsRNAs podem ser alterados por exposição a um disruptor endócrino ou pela dieta (12). Já em humanos, estudos mostram que os tsRNAs podem ser alterados pela obesidade (12).

Os miRNAs, constituídos por 20 a 22 nucleotídeos, formam um grande grupo de RNAs que são transcritos e processados a miRNAs (14,19) Estes atuam por degradação de alvos de RNA mensageiro (mRNA) ou repressão traducional (14,19). Contêm sequências com complementaridade ao mRNA específico e com a assistência do *RNA-induced silencing complex* (RISC), que se liga ao mRNA-alvo, resultando na inibição ou paragem da tradução (19). Os miRNAs são alterados pela dieta, genótipo parental e por stresse psicológico observado tanto em ratinhos como em humanos (12).

Tanto os tsRNAs como os miRNAs podem interagir com proteínas de ligação aos sRNAs da família *argonaute* para a indução do silenciamento génico pós-transcricional (12).

O piRNA foi descrito em 2006, tendo sido posteriormente identificado em vários organismos (18). São sequências ligeiramente mais longas quando comparadas com os miRNAs e com uma expressão mais específica na linha germinativa (18). Tem como principal função a prevenção da alteração no genoma causado por uma reativação de um transposão (18). Pode ainda atuar no silenciamento génico pós-transcricional, bem como desempenhar funções no sistema imunitário (18).

Os lncRNAs são abundantes no cérebro, assim como os miRNA, acabando por em alguns casos partilhar mecanismos de biogénese (14).

Acomodação genética e plasticidade do DNA

Num mundo em constante mudança, o conhecimento de processos que influenciam a capacidade das populações desenvolverem uma resposta aos processos de seleção natural é crucial para a preservação da biodiversidade (20). Muitas espécies têm vindo a experienciar alterações nos limites da sua tolerância fisiológica, ficando, por isso, mais vulneráveis ou até mesmo em risco de extinção (7). A plasticidade genotípica é um mecanismo importante para que as populações possam adaptar-se às alterações na ambiência, ocorrendo uma variação de fenótipo, produzido por um genótipo, que varia conforme a ação da ambiência (7,21). Este fenómeno permite ainda uma redução dos efeitos causados por essas alterações, como por exemplo a composição das fibras dos músculos dos peixes ou a aclimação à temperatura por ajuste do tempo de respiração das aves (7). Assim, juntamente com a evolução adaptativa, a plasticidade desempenha um papel relevante na resposta das espécies às alterações climáticas, facilitando ou dificultando a evolução, uma vez que pode alterar o grau de expressão dos fenótipos nas populações (21).

Tem vindo a ser debatido, ao longo dos anos, o impacto que a plasticidade tem na evolução (20). Alguns estudos defendem que a plasticidade apenas impede a evolução, uma vez que, neste ponto de vista, se um genótipo consegue produzir vários fenótipos, em resposta a uma alteração da ambiência, a plasticidade deveria proteger as populações de uma seleção direcionada (20). Por outro lado, é defendido que a plasticidade possui um papel decisivo na evolução (20). Tomando como exemplo a resposta ao aquecimento global, as espécies podem responder de vários modos, por deslocação para novas áreas geográficas que apresentem um intervalo de temperatura ótimo, podem acomodar-se genotipicamente de modo a aumentarem esse intervalo e, ainda, experienciar epivariações não compatíveis com

o intervalo de temperatura ótimo (22). Tal influencia o fenótipo inicial, verificando que a plasticidade pode funcionar como um condicionante da adaptabilidade ao local (20).

O *evolutionary rescue* é também um conceito relevante nesta matéria verificando-se quando a evolução adaptativa permite evitar a extinção de uma população provocada por uma modificação aguda da ambiência (20). A plasticidade fenotípica adaptativa pode diminuir o risco de extinção por permitir que uma população se aproxime de um equilíbrio ótimo, aumentando a probabilidade da manutenção de certo fenótipo (21). Uma população maior e com maior tempo de manutenção, facilitado pela plasticidade fenotípica, pode, por sua vez, favorecer o *evolutionary rescue* por permitir um maior tempo para que a adaptação ocorra (21).

A figura 3 mostra os possíveis padrões de variação genética na plasticidade, descritos como uma reação normal, mostrando a relação entre a variação da ambiência e a variação do fenótipo num único genótipo (20). As alterações evolutivas da plasticidade vão depender da sua variação genética, de alterações da ambiência e ainda de modificações nas características consideradas normais (21). As possíveis alterações evolutivas incluem o aumento da plasticidade, caso os genótipos se aproximem dos fenótipos da característica ideal, cujo fenómeno se designa acomodação génica, observado na Figura 3A (21). Seguidamente, pode ser observada uma perda de plasticidade de dois modos, caso as alterações verificadas na ambiência se tornem estáveis, é designado de assimilação génica, como pode ser verificado na Figura 3B (21). Caso a perda de plasticidade ocorra como adaptação para resistir às alterações da ambiência, se a plasticidade for não-adaptativa, desenvolve-se o fenómeno de compensação génica como observado na Figura 3C (21).

Uma comparação dos transcriptomas embrionários de indivíduos de *Pieris rapae* e *Podarcis muralis*, revelou divergências na expressão génica entre as populações nativas e não nativas (21). Neste caso, a alteração evolutiva apresentou-se num nível de expressão *baseline* na população não nativa em vez de apresentar plasticidade à temperatura, estando este padrão representado na Figura 3D (21). Um dos modos mais comuns das populações desenvolverem fenótipos específicos é através da variação devido ao gradiente latitudinal (21). A sensibilidade metabólica e o tempo de adaptação à temperatura são exemplos deste fenómeno, como pode ser observado na Figura 3E (21). É muito comum em peixes, invertebrados, insetos e anfíbios (21).

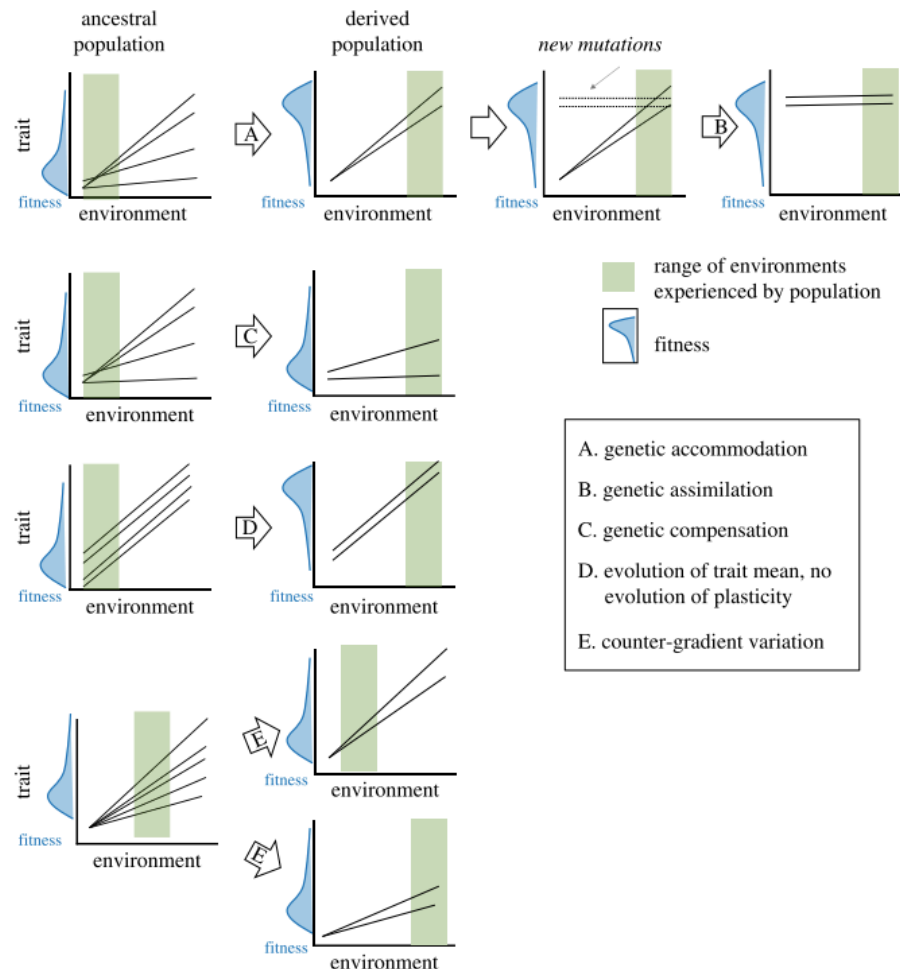


Figura 3 – Alterações evolutivas na plasticidade fenotípica. As curvas mostram as variações que podem ocorrer antes e após uma modificação na ambiência, seguido de um processo de seleção natural. As caixas (verde) indicam o alcance das ambiências experienciadas pela população, enquanto as linhas no eixo das ordenadas (azul) mostram a relação entre os fenótipos e o desempenho de uma determinada população (21).

Ambiência gestacional

A fertilização, os estádios embrionários mais precoces e o período fetal são momentos críticos para o desenvolvimento embrionário (4). A reprogramação epigenética, a rápida diferenciação celular e a organogénese são os estádios mais sensíveis à ação que as alterações da ambiência provoca (3). O desenvolvimento intrauterino divide-se em duas fases, a fase embrionária, que se prolonga até à 8ª semana e que envolve a proliferação, organização e diferenciação do embrião (3). E a fase fetal, considerada desde a 9ª semana até ao nascimento, que consiste no crescimento contínuo e maturação funcional dos diferentes tecidos e órgãos (3).

Em 2010 foi proposta uma teoria sobre doenças de origem embrio-fetal, que defende que o desenvolvimento não normal dos gametas ou do embrião pode induzir a fragilidades na saúde do indivíduo após o nascimento (3). Os períodos embrionário e fetal são vulneráveis a alterações da ambiência e as alterações adquiridas podem persistir transgeracionalmente, apesar de não existir uma exposição contínua ao estímulo (3). Neste ponto, considerando uma alteração que seja adquirida num desses momentos do desenvolvimento, para que haja transmissão transgeracional, é necessária a existência de plasticidade com posterior acomodação em F1 e fixação em F2, não sendo necessário uma exposição contínua para que o fenótipo seja expresso. Uma possível explicação para este fenómeno é a regulação epigenética do genoma humano em que as alterações no fenótipo celular ou da expressão génica são resultado de outros mecanismos que não envolvem alterações no DNA associado (3).

A gametogénese e a maturação, quando comparadas com o desenvolvimento embrionário e fetal, demoram décadas e são consequentemente mais vulneráveis a potenciais alterações por um maior período de tempo (3). Assim, o estudo de doenças deve ser focado não só na gametogénese e no desenvolvimento embrionário, mas também nos oócitos e espermatozóides (3). Respostas adaptativas dos gametas ou do embrião quando em contacto com um fator adverso, quer seja ele nutricional, resultante de contacto com toxinas, produtos químicos de desregulação endócrina, sistemas de cultura ou até de manipulações em tecnologias de reprodução assistida, torna-os mais suscetíveis a alterações permanentes de tecidos e órgãos, deficiências congénitas, assim como ao desenvolvimento de doenças crónicas em idade adulta (3). Estas alterações podem também ser transmitidas, à descendência, por hereditariedade epigenética inter ou transgeracional ou por reprogramação epigenética de genótipos ou características adversas (3).

Vários estudos sugerem uma associação entre um desenvolvimento menos saudável de um indivíduo e o risco aumentado de *Noncommunicable Diseases* (NCDs) em idade adulta, como cancro ou alterações neurológicas, incluindo ainda comorbilidades cardiovasculares e metabólicas, como hipertensão, obesidade e diabetes tipo 2 (3).

A ambiência periconcepcional mediada pela dieta materna pode também modificar o desenvolvimento durante a gestação e pode afetar a saúde metabólica e fisiológica da descendência (3). Foi aplicado, em modelos animais constituídos por fêmeas, uma restrição proteica durante o período de pré-implantação (3). Após esse período foi iniciada uma dieta normal (3). Esta restrição mostrou ser suficiente para causar alterações cardiovasculares, metabólicas e neurológicas na descendência em idade adulta (3).

Espermatozóide e hereditariedade adquirida

Pela análise de modelos animais observou-se que a ambiência paterna tem um papel importante na hereditariedade de NCD, devido às exposições pré-concepcionais na linha germinativa masculina (4). Um estímulo na ambiência do progenitor masculino antes da concepção pode aumentar o risco da sua descendência desenvolver doenças crónicas, sendo a regulação epigenética da expressão génica crítica durante a espermatogénese (3). Nos humanos, a desmetilação da citosina em embriões pré-implantados tem uma elevada semelhança com os embriões de ratinho no estágio equivalente (3). No entanto, com a sequenciação de DNA e RNA, é possível observar as zonas metiladas e desmetiladas das células pré-natais humanas da linha germinativa (3). Dos 53 aos 137 dias de desenvolvimento, verifica-se uma distinção do transcriptoma e do metiloma da linha germinativa humana quando comparada com as células estaminais e com a massa celular interna dos blastocistos humanos (3).

A subnutrição leva a uma produção de sRNAs herdados por, pelo menos, três gerações consecutivas, tendo como genes-alvo genes associados ao perfil nutricional (3). Foi verificado que os RNAs presentes no espermatozóide podem desempenhar o papel de *carriers* moleculares que transmitem características paternas adquiridas à descendência (3).

No que concerne ao stresse crónico paterno, os miRNAs encontram-se aumentados no espermatozóide dos indivíduos expostos a situações de stresse e associados com uma diminuição da ação do eixo hipotálamo-hipófise na descendência (3). O stresse traumático numa fase precoce do desenvolvimento altera a expressão dos miRNAs e as respostas comportamentais e metabólicas da descendência (3). Injeções de RNAs de espermatozoides de ratinhos, que experienciaram uma situação traumática, em oócitos provocou alterações metabólicas e comportamentais na descendência (3). Com a injeção de tsRNAs em zigotos normais, verificou-se que estes podem desencadear alterações metabólicas na descendência (3). Outro estudo mostrou que a microinjeção, em zigotos, de RNAs de testículo ou de espermatozóide de ratinhos, submetidos a uma dieta rica em gordura ou açúcar, gerou uma descendência em que se verificaram fenótipos de doenças metabólicas de origem paterna (3). A deleção da metiltransferase tRNA no ratinho, DNMT2, pode prevenir o aumento do número de modificações no RNA, induzidas pela dieta rica em gordura ou açúcar, modificar o perfil de expressão do sRNA do espermatozóide e inibir a transmissão à descendência, mediada por sncRNAs, de alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em gordura (3).

No útero, a privação nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento dos gâmetas pode afetar o desenvolvimento do metiloma da linha germinativa masculina, podendo levar

ao desenvolvimento de doenças metabólicas na descendência (3). Mostrou-se que a ambiência nutricional intrauterina dos embriões F1 alterava o metiloma do DNA da linha germinativa dos adultos machos de F1 em *loci* específicos, afetando o metabolismo de F2 (3). As regiões diferencialmente metiladas foram hipometiladas e enriquecidas em *nucleosome-retaining regions* (3). A subnutrição durante a gestação, mesmo quando seguida de uma nutrição normal pós-natal pode comprometer o desenvolvimento da linha germinativa masculina e a reprogramação epigenética (3).

Oócito e hereditariedade adquirida

O metabolismo materno é conhecido por afetar a qualidade do oócito, causando um atraso no desenvolvimento fetal e anomalias a nível do desenvolvimento (23). Esta influência é também verificada durante a transferência de uma ambiência associada a stresse para uma ambiência uterina normal (23). A privação a nível nutricional e modificações na dieta afetam a qualidade do oócito e induzem defeitos no desenvolvimento fetal, estas alterações são normalmente atribuídas a modificações epigenéticas (23).

A obesidade materna tem efeitos secundários no oócito e no estágio de pré-implantação do embrião, contribuindo para a morbilidade da descendência (3). Comparando com grupos controlo, ratinhos obesos por dieta induzida têm maior número de folículos que sofreram apoptose, oócitos em menor número e dimensão, menor quantidade de IGF-IR embrionário, fetos mais pequenos, aumento de mRNA Igf2r placentário e recém-nascidos mais pequenos (3). Os recém-nascidos apresentaram uma recuperação no crescimento, intolerância à glucose, aumento do colesterol e gordura corporal, sugerindo o desenvolvimento precoce de uma síndrome metabólica (3).

A subnutrição materna causa efeitos adversos na maturação dos oócitos (3). Uma dieta normal em proteínas ou uma dieta isocalórica e hipoproteica foi restringida a um ciclo ovulatório (3,5 dias) antes do período de acasalamento natural do ratinho fêmea (3). Após o acasalamento as fêmeas receberam uma dieta normal em proteínas durante a restante gestação (3). Apesar de não terem sido verificadas alterações a nível da duração do período de gestação, da dimensão dos fetos, rácio sexo-sexo e crescimento pós-natal, uma dieta hipoproteica induziu comportamentos não normais relacionados com ansiedade e alterações a nível cardiovascular, como a elevação da pressão sistólica da descendência (3).

Epigenética associada a químicos

Os químicos associados à desregulação endócrina são conhecidos por interferirem negativamente com a função reprodutiva normal e com as vias de sinalização hormonal (24).

Destacam-se os ftalatos, bisfenol A (BPA), pesticidas e contaminantes, como bifenilos policlorados (PCB) e dioxinas (24). Estes são encontrados em plásticos, produtos de cuidados pessoais e pesticidas (24). Os humanos encontram-se em constante exposição a estes químicos através da sua inalação, ingestão e contacto, resultando em efeitos na saúde reprodutiva dos mesmos (24). Estudos realizados em animais descrevem uma diminuição da fertilidade tanto em machos como em fêmeas, estando associado à infertilidade em humanos por afetarem a síntese de esteróides, o desenvolvimento dos folículos ovários bem como o desenvolvimento e maturação dos espermatozóides (24). Recentemente, foi mostrado que estes compostos causam efeitos inter e transgeracionais (24).

Os ftalatos são um grupo de químicos utilizados em inúmeros produtos como dispositivos médicos, materiais de construção ou produtos de consumo (24). Estudos realizados em animais mostram uma redução do crescimento do folículo ovário e da produção de hormonas (24). Na mulher, foi associado ao aumento do tempo de gestação e ao aparecimento de afrontamentos, no homem foi relacionado com a diminuição da motilidade progressiva dos espermatozóides (24). Adicionalmente aos efeitos diretos na reprodução, os ftalatos mostraram ter efeitos transgeracionais em machos (24). Um estudo realizado em ratinhos, cujas progenitoras foram expostas aos ftalatos desde o 8º ao 14º dia do período de gestação, mostrou um decréscimo do número de espermatozóides e de células de Sertoli em machos F1, F2 e F3 (24). Este decréscimo pode ser devido a uma redução na betaína-homocisteína metiltransferase, causando uma hipometilação em todo o genoma (24). Em fêmeas foram também observados efeitos transgeracionais após exposição desde o 14º dia de gestação até ao nascimento, foi observada, na descendência, uma diminuição na dimensão, peso e distância anogenital (24). Foram ainda verificados efeitos transgeracionais ao nível do ovário, ocorrendo uma diminuição no número de folículos primordiais, nos ratinhos expostos aos ftalatos desde o início da gestação até ao fim da fase de lactação, observou-se, em F3, um aumento dos folículos pré-antrais (24). Os dados recolhidos sugerem que a exposição ao ftalatos pode acelerar a foliculogénese no ovário de modo transgeracional (24).

O BPA é um composto sintético utilizado como plastificante em resinas epóxi e plásticos policarbonados, estando os humanos expostos a este composto por inalação e maioritariamente por ingestão (24). Um estudo realizado em ratinhos fêmea mostrou que após exposição oral de F0 ao BPA, desde o 11º dia da gestação até ao nascimento, ocorreu uma alteração na expressão dos genes associados à apoptose, aumento da expressão de genes com ação antioxidante, alteração da expressão em genes da família Igf, diminuição da expressão do gene associado ao recetor de estrogénio (Esr1) e aumento da expressão das

enzimas esteroidogénicas nos ovários de um ratinho fêmea da F3, no 21º dia após o nascimento (24).

Estudos realizados em ratinhos fêmea prenhas, F0, mostraram que quando estas foram expostas ao disruptor endócrino vinclozolina, durante o período de formação das gónadas do embrião, F1, este desenvolveu maior incidência de várias doenças como o aumento da apoptose das espermatogónias e alterações a nível renal através de um mecanismo que não se baseava em mutações (25). Verificou-se que apesar de a exposição ter ocorrido em F0, o fenótipo e a frequência da doença persistiu ao longo das gerações (25). A hereditariedade epigenética transgeracional de fenótipos não normais, induzida pela vinclozolina, é transmitida principalmente por via paterna (25). Assim sendo, os ratinhos com alterações provocadas pela vinclozolina ao nível dos espermatozóides transmitiram essa informação à descendência (25). Foram investigadas alterações dos sncRNAs nos espermatozóides de uma F3 controlo e de uma F3 descendente de ratinhos expostos à vinclozolina (25). Mais de 200 sncRNAs expressos foram identificados e os sncRNAs derivados de tRNAs, nomeadamente nas extremidades 5' dos tRNA maduros, foram os locais onde se verificaram um maior número de alterações (25). Os genes-alvo dos miRNAs e extremidades 5' revelaram uma associação entre os sncRNAs alterados e as regiões metiladas do DNA (25). sncRNAs desregulados foram correlacionados com perfis de mRNAs presentes nos fenótipos em doenças induzidas pela vinclozolina, previamente observados (25). Os dados recolhidos sugerem uma potencial relação entre a transmissão de mRNAs pelos espermatozóides e a hereditariedade epigenética transgeracional induzida pela vinclozolina (25).

As dioxinas são poluentes ambientais aos quais os humanos são expostos por ingestão de alimentos (26). Verificou-se que as dioxinas podem diminuir o rácio macho/fêmea da descendência assim como diminuir a *performance* reprodutiva, a par com outros efeitos adversos para as gerações subsequentes, mais observado quando a via paterna se encontra afetada (26). Estes impactes são acompanhados por alterações epigenéticas na placenta e/ou nos espermatozóides, incluindo alterações nos padrões de metilação dos *imprinted genes* (26).

O DDT é um pesticida ainda utilizado nos países africanos e asiáticos para o controlo da malária (24). É um composto de biodegradação lenta, tendo como consequência uma constante exposição no ambiente e a sua acumulação na cadeia alimentar, que mostrou ter um efeito negativo na fertilidade (24). A geração F0 de ratinhos foi exposta ao DDT desde o 8º ao 14º dia de gestação, verificou-se um aumento da incidência de doenças no testículo e uma diminuição do número de espermatozóides em F3 (24). A exposição de F0 foi ainda

relacionada com o aumento da doença no ovário em F4 (24). O DDT promove suscetibilidade à doença no ovário por um mecanismo de hereditariedade epigenética transgeracional, ao causar alterações na metilação do DNA e na expressão dos ncRNAs e dos mRNAs nas células da granulosa do ovário de ratinhos fêmea jovens em F3 (24).

PTSD

A transmissão transgeracional do stresse pós-traumático derivado de experiências traumáticas tem vindo a ser estudada na descendência de sobreviventes do Holocausto, veteranos de combate e de famílias de refugiados (3,16). A hereditariedade dos efeitos de stresse traumático envolve a transmissão através das células germinativas e implica mecanismos epigenéticos (14). Em roedores, o stresse traumático tem mostrado afetar o comportamento, funcionamento cognitivo e metabolismo das gerações subsequentes através de mecanismos epigenéticos complexos que não se encontram totalmente definidos (14). Nos humanos existem efeitos semelhantes, mas o mecanismo encontra-se ainda menos definido (14).

Estudos em roedores têm utilizado diferentes paradigmas incluindo o cuidado materno interrompido ou prejudicado, bem como a separação materna (14). À semelhança do que acontece nos animais, o cuidado parental parece ser um forte determinante na hereditariedade transgeracional dos efeitos do stresse traumático nos humanos (14).

Foi elaborado um estudo baseado na transmissão transgeracional de fenótipos comportamentais e metabólicos até à 4ª geração, utilizando ratinhos, expostos a trauma paterno pós-natal (13). Mostrou que os comportamentos associados à depressão da descendência eram transmitidos até à 3ª geração e a desregulação da glucose até à 4ª geração, quando transmitida por machos (13). Os sintomas foram consistentes, reprodutíveis e persistiram, entre gerações, com severidade semelhante (13). Estes resultados providenciam uma forte evidência de que as condições adversas experienciadas no período pós-natal precoce podem ter efeitos transgeracionais e que o trauma paterno pós-natal é também transmitido à descendência por mecanismos associados à hereditariedade epigenética transgeracional (13).

Estudos realizados, em humanos, durante o “Inverno da Fome”, na Holanda (1944-1945), mostraram que apenas quando a exposição à fome ocorre durante as primeiras 10 semanas de gestação em F0, são observadas alterações na metilação do DNA da descendência em genes associados ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo (3). Em 2009 foi conduzido um estudo com 923 indivíduos no qual se concluiu que a exposição materna à

fome antes da concepção provocou na sua descendência uma maior suscetibilidade a perfis de depressão em idade adulta (3). Em 360 indivíduos adultos pertencentes à descendência (F2) de um grupo de homens e mulheres (F1) nascidos durante o “Inverno da Fome”, a descendência de indivíduos masculinos subnutridos em período pré-natal mostrou-se com mais peso e mais obeso, com intolerância à glucose e doenças crónicas em idade adulta em comparação com a descendência de indivíduos que receberam uma dieta normal antes da concepção (3).

Mais recentemente, a exposição ao trauma em sobreviventes do Holocausto mostrou induzir alterações neuropsiquiátricas na sua descendência, podendo estar associado com alterações em algumas marcas epigenéticas, particularmente metilação do DNA na proteína 5 do gene de ligação FK506 (14). A descendência de sobreviventes do Holocausto tem uma maior suscetibilidade em desenvolver stresse pós-traumático, principalmente de sobreviventes do sexo feminino, e que poderá estar relacionado com o baixo nível de cortisol (14). O aumento de sintomas de ansiedade foram também reportados na descendência de indivíduos que desenvolveram hiperexcitação relacionada com o genocídio no Camboja e aumento do risco de depressão e ansiedade na descendência de indivíduos expostos ao genocídio no Ruanda (14).

Foi postulada uma recente hipótese epigenética que defende a existência, nos humanos, de efeitos transgeracionais específicos associados ao sexo masculino, que podem ser despoletados por trauma durante a infância e durante o período de crescimento mais lento, idades compreendidas entre 8 a 12 anos, antes da puberdade (27). Após a apresentação desta hipótese foi desenvolvido um estudo que permitiu analisar a influência que o trauma, experienciado durante a infância, tem no risco de alteração da dimensão do indivíduo à nascença e do risco de nascimento prematuro contando com uma amostra de 800 000 descendentes (27). A 3ª geração (F3) foi constituída por indivíduos com paridade, de nascimento, de 1, 2 ou 3, nascidos entre 1976 e 2000, na Suécia (27). Foi também critério a capacidade de rastrear todos os indivíduos de F1 e F2 (27). Cerca de 5% de F2 sofreram morte parental durante a infância (27). Foi analisada a associação do trauma em F2 com o peso à nascença, o nascimento prematuro e se o período de crescimento mais lento é sensível à perda parental, em F3 (27). Os resultados do estudo mostraram que a morte parental (F1) durante a infância de F2 é preditiva de uma alteração da dimensão ao nascimento, assim como ao nascimento prematuro em F3 (27). Verificou-se que os resultados são dependentes do género, da idade de exposição ao trauma de F2 e da paridade de F3, mas, no entanto, não se verificou dependência ao género em F3 (27). Assim, os resultados mostraram-se compatíveis com a hipótese apresentada de que o trauma experienciado

durante o período de crescimento mais lento, em machos, pode despoletar uma resposta transgeracional (27). No entanto, a idade de exposição de fêmeas parece não ter desenvolvido uma resposta transgeracional, sugerindo um conjunto de vias diferentes para a transmissão (27). Verificou-se ainda que a morte parental durante a infância não influencia o peso à nascença nem o nascimento prematuro (27).

A migração tem atingido recordes em todo o mundo. No entanto, enquanto alguns indivíduos abandonam o seu país para educação ou por oportunidades de emprego, outros são forçados a abandonar o seu país natal devido a conflitos ou abuso dos direitos humanos (28). Muitos destes indivíduos procuram proteção em outros países como refugiados (28). O processo de adaptação a outra cultura pode criar situações de stresse, tanto para migrantes como para refugiados, que aumentam o risco de alterações a nível físico e mental (28). O stresse, nos refugiados, pode ser causado por situações traumáticas como experienciar ou testemunhar situações de abuso físico, morte ou ameaças a outros, separação familiar, campos de refugiados, prisões, longos períodos de acesso limitado a bens essenciais como água e comida (28). Como sintomas mais prevalentes, após uma situação de stresse, temos a depressão e a ansiedade, que podem persistir vários anos após a mudança de país, aumentando a preocupação sobre potenciais efeitos transgeracionais nas famílias (28). O stresse a que os progenitores são sujeitos durante a sua vida é provável de ser transferido à descendência através de processos epigenéticos nas células da linha germinativa (29). Estes processos epigenéticos poderão contribuir para a reprogramação da resposta e desenvolvimento dos mecanismos de stresse na descendência, fatores críticos para o aumento de vulnerabilidade à PTSD (29). A metilação do DNA tem sido associada ao stresse psicossocial, trauma infantil, depressão e PTSD (29). Foram realizados estudos com veteranos de guerra em que se localizaram genes em células do sangue periférico com diferentes níveis de metilação do DNA associados à PTSD (29). Mostraram ainda que algumas dessas marcas de metilação do DNA são associadas a uma expressão génica diferencial (29). Uma vez que as alterações na metilação do DNA se acumulam ao longo do tempo, a assinatura molecular da exposição a um trauma pode ser substancialmente evidente antes do desenvolvimento de sintomas de uma doença (29). A descendência de indivíduos com PTSD mostrou ter uma maior probabilidade de desenvolver PTSD ao longo da vida (29). A descendência de judeus com PTSD provocado pelo Holocausto mostrou menor nível de cortisol basal no plasma e taxas mais elevadas de PTSD (29). Foram realizadas três análises, uma para testar o aumento da metilação do DNA associado à PTSD no espermatozóide e no sangue periférico, outra para identificar os perfis de metilação do DNA do espermatozóide, associado à PTSD, e a terceira para testar os fenótipos psiquiátricos paternos e os perfis de metilação do DNA no espermatozóide, associados a uma condição mental reportada em um

ou mais descendentes (29). Foram identificados três “ilhéus CpG” como relacionados com a severidade dos sintomas específicos da PTSD no espermatozóide (29). Dos 1176 genes relacionados com a PTSD, e presentes no espermatozóide e no sangue periférico, 145 deles foram ainda associados a relatos de condições de saúde mental, em descendentes em idade adulta (29). Estes genes foram considerados como genes cuja metilação do seu DNA pode ser transmitida por via transgeracional através da linha germinativa (29).

A exposição a conflito armado durante a infância pode afetar o desenvolvimento psicossocial, que resulta em estilos parentais alterados em idade adulta, alterações epigenéticas que são transmitidas às próximas gerações e, na mulher, pode ainda provocar alterações na gestação e, consequentemente, no desenvolvimento fetal (30).

Num estudo relacionado com crianças evacuadas da Finlândia e inseridas em famílias de acolhimento suecas durante a 2ª Guerra Mundial, os indivíduos do sexo feminino mostram ter uma probabilidade duas vezes superior de serem hospitalizados por alterações de humor durante a idade adulta, quando comparados com os seus irmãos não evacuados, suportando a evidência da relação entre a saúde mental e a exposição à guerra (30). De modo a relacionar a hereditariedade transgeracional da exposição à guerra com a saúde mental foi investigado se os descendentes dos indivíduos finlandeses evacuados foram mais suscetíveis de serem hospitalizados devido a uma doença mental do que os descendentes não evacuados (30). Os resultados sugerem a existência de diferenças no risco de hospitalização psiquiátrica entre a descendência de indivíduos evacuados durante a 2ª Guerra Mundial, maioritariamente na descendência do sexo feminino e cujas progenitoras foram evacuadas e colocadas em famílias de acolhimento durante a infância, quando comparadas com os seus primos do sexo masculino (F2) cuja F1 permaneceu com os seus progenitores durante a guerra (30). Não foram encontrados aumentos nas hospitalizações psiquiátricas de indivíduos do sexo masculino cujas progenitoras foram evacuadas (30). Considera-se que a associação recorrente da hereditariedade transgeracional da evacuação de indivíduos, durante a infância, sem os seus progenitores e as hospitalizações psiquiátricas entre a descendência do sexo feminino de mães evacuadas é importante por permitir suportar a evidência de que o trauma durante a infância é transmitido às gerações seguintes e que existem padrões com especificidade ao nível dos gametas (30).

Foi realizado um estudo longitudinal com refugiados vietnamitas em que se observou a sua chegada à Noruega em 1982 (T1). Foram rastreados em 1985 (T2) e também em 2005/2006 (T3) (31). Em T3 foram incluídos os cônjuges e a descendência nascida na Noruega (31). O estudo teve como foco a saúde mental dos progenitores e da descendência nascida na

Noruega (31). Verificou-se que em T3, 30% das famílias vietnamitas tinham um dos progenitores com um elevado *score* de stresse categorizado como um caso provável de acordo com o *Global Severity Index* (GSI) (Vaage AB, *Paternal predictors of the mental health of children of Vietnamese refugees*, 2011), enquanto apenas 4% das crianças foram consideradas como casos prováveis pelo *Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ) (publicado por Goodman R., *The Strengths and Difficulties Questionnaire: a research note.*, em 1997, citado por Vaage AB, *Paternal predictors of the mental health of children of Vietnamese refugees*, 2011) com idades entre os 10 e os 18 anos ou pelo GSI se idades compreendidas entre 18 e 23 anos (31). Apesar do baixo nível de psicopatologia na descendência, foi feita uma associação entre uma provável relação de causalidade entre a descendência e os progenitores de T3 (31). As experiências traumáticas sem desenvolvimento de PTSD em T1 não provocaram problemas mentais na descendência (31). Um dos preditores paternos mais significantes foi a PTSD à chegada e não o nível geral de stresse psicológico (31). É também importante referir que a descendência de vietnamitas noruegueses, como grupo, reportaram menos ocorrências de stresse psicológico do que os seus pares noruegueses, apesar da alta exposição à adversidade pré-migratória e do facto de 30% dos progenitores machos terem reportado PTSD total ou parcial em T1/T2 (31). Estas duas análises indicam que poderá existir uma acomodação na segunda geração, enquanto os problemas mentais dos progenitores podem ser associados a uma psicopatologia subsequente numa descendência mais vulnerável (31).

Um estudo da descendência de mulheres grávidas durante o genocídio dos Tutsi, em 1994, investigou as alterações epigenéticas associadas à PTSD (30). Os resultados mostraram que tanto as progenitoras como a descendência tinham níveis mais elevados de depressão e PTSD, assim como maiores níveis de metilação do DNA no exão 1_F da região promotora do gene do recetor de glucocorticóides (NR3C1) em comparação com os grupos controlo (32). Posteriormente, mostrou-se que descendência com PTSD do lado paterno e não materno tinham níveis superiores de metilação do DNA no exão 1_F da região promotora do gene do recetor de glucocorticóides, enquanto a descendência com PTSD materno e paterno mostraram perfis de metilação do DNA mais baixos (32). Conclui-se que os efeitos paternos da PTSD são modelados pelos efeitos maternos da PTSD (33). A baixa metilação da região promotora do exão 1_F do recetor glucocorticóide (GR) foi associada com uma elevada supressão do cortisol após administração de dexametasona (33). Num estudo posterior, foram analisadas as alterações transgeracionais da metilação do DNA no gene que regula a sensibilidade do GR (FKBP5) em sobreviventes do Holocausto (34). Foi identificada uma elevada metilação do DNA do intrão 7 do gene FKBP5 na descendência, sugerindo que este efeito pode estar relacionado a uma acomodação por parte da descendência (34).

Um estudo elaborado com o objetivo de analisar o impacto no estilo de vida parental na transmissão transgeracional do trauma, entre sobreviventes do regime de Khmer Rouge, no Camboja, comparou progenitoras com a descendência feminina na adolescência (35). No primeiro estudo, foram recrutadas 46 estudantes do sexo feminino a frequentar o ensino secundário e as suas progenitoras (35). Na descendência foram analisados os níveis de ansiedade e de depressão assim como a sobreproteção ou rejeição parental, enquanto nas progenitoras foram analisados os níveis de exposição traumática ao regime de Khmer Rouge e sintomas de PTSD (35). Como apoio à transmissão transgeracional derivada de situações consideradas traumáticas, os sintomas maternos de PTSD foram preditivos da ansiedade verificada na sua descendência (35). O estudo mostrou ainda que a reversão do papel materno nos estilos de vida parentais, mediavam a relação entre os sintomas da progenitora e os da descendência (35). Os resultados foram replicados num segundo estudo no qual se compararam 15 progenitoras camboja-americanas refugiadas, que procuravam tratamento com a sua descendência na adolescência, com 17 pares de progenitoras e descendentes que não procuraram tratamento (35).

Conclusão

O estudo da epigenética tem vindo a contribuir para um maior conhecimento acerca dos mecanismos e processos envolvidos na hereditariedade epigenética transgeracional. No entanto, os estudos realizados em humanos ainda carecem de algum desenvolvimento e de um aumento das gerações estudadas bem como, do estudo dos mecanismos envolvidos neste tipo de hereditariedade.

Os exemplos descritos, que sugerem uma relação entre a exposição a um evento traumático com a hereditariedade epigenética transgeracional, permitem concluir que é necessária uma maior atenção aos acontecimentos da atualidade. Como verificado, a exposição a certos elementos químicos, fome, guerra ou até mesmo à migração forçada podem ter um impacto negativo nas gerações subsequentes. A Responsabilidade Social não deverá ser descorada e deverão ser tidos em atenção, e ser dado o devido acompanhamento, aos indivíduos que se encontrem em situações semelhantes aos exemplos mencionados, de modo a diminuir os efeitos decorrentes das situações traumáticas, para que não haja o comprometimento das gerações futuras.

O próximo passo deverá passar pela consciencialização da população e principalmente dos profissionais de saúde, para esta temática, desenvolvendo estratégias de acompanhamento e de apoio para os indivíduos sujeitos às situações supramencionadas.

Referências Bibliográficas

1. Manjrekar J. Epigenetic inheritance, prions and evolution. *J Genet*. 2017;96(3):445–56.
2. Van Otterdijk SD, Michels KB. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: How good is the evidence? *FASEB J*. 2016;30(7):2457–65.
3. Zou K, Ding G, Huang H. Advances in research into gamete and embryo-fetal origins of adult diseases. *Sci China Life Sci*. 2019;62(2010).
4. Perera BPU, Faulk C, Svoboda LK, Goodrich JM, Dolinoy DC. The Role of Environmental Exposures and the Epigenome in Health and Disease. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2019; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/em.22311>
5. Lexie Prokopuk1 P, S Western & Jessica M, Stringer. Transgenerational epigenetic inheritance: adaptation through epigenome? *Epigenomics* [Internet]. 2015;7(5):829–46. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/pdfplus/10.2217/epi.15.36>
6. Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(12):774–90.
7. Hu J, Barrett RDH. Epigenetics in natural animal populations. *J Evol Biol*. 2017;30(9):1612–32.
8. Barbosa M, Joshi RS, Garg P, Martin-Trujillo A, Patel N, Jadhav B, et al. Identification of rare de novo epigenetic variations in congenital disorders. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04540-x>
9. Bošković, A., & Rando OJ. Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Epigenome Dev Orig Heal Dis* [Internet]. 2018;(August):425–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128013830000219>
10. Shea JM, Serra RW, Carone BR, Shulha HP, Kucukural A, Ziller MJ, et al. Genetic and epigenetic variation, but not diet, shape the sperm methylome HHS Public Access. *Dev Cell*. 2015;35(6):750–8.
11. Mørkve Knudsen T, Rezwan FI, Jiang Y, Karmaus W, Svanes C, Holloway JW. Transgenerational and intergenerational epigenetic inheritance in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018;142(3):765–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.007>
12. Perez MF, Lehner B. Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019;21(2):143–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0242-9>
13. van Steenwyk G, Roszkowski M, Manuella F, Franklin TB, Mansuy IM. Transgenerational inheritance of behavioral and metabolic effects of paternal exposure to traumatic stress in

- early postnatal life: evidence in the 4th generation. *Environ Epigenetics*. 2018;4(2):1–8.
14. Jawaid A, Roszkowski M, Mansuy IM. Transgenerational Epigenetics of Traumatic Stress [Internet]. 1st ed. Vol. 158, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2018. 273–298 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.03.003>
 15. Ben Maamar M, Sadler-Rigglesman I, Beck D, Skinner MK. Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered Sperm Histone Retention Sites. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23612-y>
 16. Lacal I, Ventura R. Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:1–22.
 17. Zhu P, Guo H, Ren Y, Hou Y, Dong J, Li R, et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* [Internet]. 2018;50(1):12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-017-0007-6>
 18. Huang S, Ichikawa Y, Igarashi Y, Yoshitake K, Kinoshita S, Omori F, et al. Piwi-interacting RNA (piRNA) expression patterns in pearl oyster (*Pinctada fucata*) somatic tissues. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
 19. Doody KM, Bottini N, Firestein GS. Epigenetic alterations in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Epigenomics*. 2017;9(4):479–92.
 20. Kelly PW, Pfennig DW, De La Serna Buzón S, Pfennig KS. Male sexual signal predicts phenotypic plasticity in offspring: Implications for the evolution of plasticity and local adaptation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2019;374(1768).
 21. Kelly M. Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2019;374(1768).
 22. Pecl G, Figueira WF, Gaitán-Espitia JD, Rodgers GG, Pandolfi JM, Munday PL, et al. Understanding interactions between plasticity, adaptation and range shifts in response to marine environmental change. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2019;374(1768).
 23. Ou XH, Zhu CC, Sun SC. Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):7847–55.
 24. Brehm E, Flaws JA. Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on Male and female reproduction. *Endocrinology*. 2019;160(6):1421–35.
 25. Schuster A, Skinner MK, Yan W. Erratum: Ancestral vinclozolin exposure alters the epigenetic transgenerational inheritance of sperm small noncoding RNAs. *Environ Epigenetics*. 2016;2(2):1–10.
 26. Viluksela M, Pohjanvirta R. Multigenerational and Transgenerational Effects of Dioxins. *Int*

- J Mol Sci. 2019;20(12):2947.
27. Vågerö D, Rajaleid K. Does childhood trauma influence offspring's birth characteristics? *Int J Epidemiol*. 2017;46(1):219–29.
 28. Giallo R, Riggs E, Lynch C, Vanpraag D, Yelland J, Szwarc J, et al. The physical and mental health problems of refugee and migrant fathers: Findings from an Australian population-based study of children and their families. *BMJ Open*. 2017;7(11):1–12.
 29. Mehta D, Pelzer ES, Bruenig D, Lawford B, McLeay S, Morris CP, et al. DNA methylation from germline cells in veterans with PTSD. *J Psychiatr Res* [Internet]. 2019;116:42–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.06.001>
 30. Santavirta T, Santavirta N, Gilman SE. Association of the World War II finnish evacuation of children with psychiatric hospitalization in the next generation. *JAMA Psychiatry*. 2018;75(1):21–7.
 31. Vaage AB, Thomsen PH, Rousseau C, Wentzel-Larsen T, Ta T V., Hauff E. Paternal predictors of the mental health of children of Vietnamese refugees. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* [Internet]. 2011;5(1):2. Available from: <http://www.capmh.com/content/5/1/2>
 32. Perroud N, Rutembesa E, Paoloni-Giacobino A, Mutabaruka J, Mutesa L, Stenz L, et al. The Tutsi genocide and transgenerational transmission of maternal stress: Epigenetics and biology of the HPA axis. *World J Biol Psychiatry*. 2014;15(4):334–45.
 33. Yehuda R, Daskalakis NP, Lehrner A et. al. Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic gene in Holocaust survivor offspring. *Am J Psychiatry*. 2014;171(8):872–80.
 34. Yehuda R, Daskalakis NP, Bierer LM, Bader HN, Klengel T, Holsboer F, et al. Holocaust Exposure Induced Intergenerational Effects on FKBP5 Methylation. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2016;80(5):372–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.005>
 35. Field NP, Muong S, Sochanvimean V. Parental Styles in the Intergenerational Transmission of Trauma Stemming From the Khmer Rouge Regime in Cambodia. *Am J Orthopsychiatry*. 2013;83(4):483–94.